

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 702 050

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 93 02420

(51) Int Cl⁵ : G 01 N 33/543

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 26.02.93.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT JACQUES BOY — FR.

(72) Inventeur(s) : Kukla Brice et Majurel Marc.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 02.09.94 Bulletin 94/35.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Arbousse-Bastide.

(54) Procédé de groupage sanguin faisant appel à des réactions immunoenzymatiques.

(57) Ce procédé met en œuvre des anticorps spécifiques
de la classe d'immunoglobuline à laquelle appartient l'anti-
corps à tester, couplés chacun à une enzyme, dans des
plaques de microtitration à fond poreux dans les puits des-
quelles se déroulent les réactions successives, les liquides
réactionnels étant éliminés après chaque étape du proto-
cole opératoire par aspiration et lavage des puits.

FR 2 702 050 - A1



La présente invention a pour objet un procédé de groupage sanguin mettant en oeuvre des réactions immuno-enzymatiques.

5 Les techniques de groupage sanguin les plus couramment utilisées à ce jour reposent sur des réactions antigène - anticorps dans lesquelles les antigènes sont des molécules spécifiques de la membrane des globules rouges du sang à analyser, et les anticorps des molécules préparées à partir de sérum de donneurs ou par hybridation cellulaire dans le cas des
10 anticorps monoclonaux.

Dans ces techniques, le critère de positivité de la réaction antigène - anticorps est l'agglutination des globules rouges au contact de l'anticorps, qui peut être un anticorps spécifique ou un anticorps secondaire si l'anticorps utilisé ne
15 peut donner lieu à une réaction d'agglutination directe.

Ces techniques exigent de recourir à des conditions expérimentales très précises tenant à la salinité du milieu, à la présence dans ce milieu de substances macromoléculaires, ainsi qu'à la température et à la durée de l'incubation, et ce
20 sans toutefois permettre dans tous les cas une lecture facile des résultats.

Des travaux ont d'autre part été effectués en vue de mettre au point une méthode plus efficace et plus fiable de détection des antigènes du système ABO et du système Lewis dans
25 divers liquides biologiques tels que le sang, la salive ou le sperme, ou dans des taches de ces liquides.

Les articles publiés à cet égard dans des revues scientifiques, notamment dans des revues spécialisées dans la médecine légale, portent sur des travaux appliquant au groupage
30 sanguin les techniques regroupées sous le terme générique "ELISA" ("Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"), lesquelles reposent toutes sur le même principe de base, à savoir la révélation de la réaction antigène - anticorps par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique entre une enzyme
35 couplée à l'un des réactifs (antigène, anticorps ou antiglobuline) et son substrat, cette réaction provoquant un changement colorimétrique facilement observable.

Les travaux dont il est fait état dans ces articles sont pour la plupart réalisés en tubes ou en plaque de microtitration à fond solide, encore que certains décrivent une technique dans laquelle les antigènes de surface des globules rouges sont "extraits" de liquides biologiques ou de taches de tels liquides, puis fixés sur des feuilles de nitrocellulose, les antigènes retenus étant ensuite révélés par réaction avec des anticorps antiglobulines spécifiques couplés à une enzyme, ladite réaction entraînant la transformation d'un substrat chromogène.

Toutefois ces travaux, malgré l'intérêt évident qu'ils présentent, ne peuvent donner lieu à une application pratique, compte tenu des inconvénients inhérents à la mise en oeuvre des techniques qu'ils proposent.

La présente invention vise à remédier aux divers inconvénients des techniques connues en proposant un procédé de groupage sanguin de réalisation facile et conduisant à une lecture claire et aisée des résultats.

Le procédé de groupage sanguin selon l'invention se caractérise essentiellement par la mise en oeuvre d'une part d'anticorps spécifiques couplés chacun à une enzyme et d'autre part de plaques de microtitration à fond poreux dans les puits desquelles se déroulent les réactions successives.

La mise en oeuvre d'une plaque à fond poreux dans le procédé selon l'invention offre l'avantage de permettre de réaliser l'ensemble des étapes du protocole opératoire sur le même support et en continu, autorisant un gain de temps sensible par rapport à l'utilisation de tubes à hémolyse, qui nécessiterait une centrifugation après chaque étape. Elle offre d'autre part une possibilité d'automatisation du procédé, d'autant plus facile à réaliser que le format des plaques de microtitration est standardisé, et qu'il existe déjà des dispositifs automatiques de distribution des échantillons et des réactifs.

Les plaques à fond poreux permettent en effet d'éliminer les liquides réactionnels par simple aspiration des solutions au travers de la membrane poreuse qui constitue le fond des puits, ce après chaque étape du protocole opératoire.

Un autre avantage inhérent à la mise en oeuvre d'une plaque à fond poreux réside dans la possibilité qu'elle offre de conserver et d'archiver les résultats après séchage en "pelant" la membrane.

5 Les anticorps mis en oeuvre dans le procédé selon l'invention sont des anticorps spécifiques de la classe d'immunoglobuline à laquelle appartient l'anticorps dont on veut tester l'agglutination. Ce sont généralement des anticorps anti IgG ou anti IgM, couplés à une enzyme qui peut être par exemple
10 la phosphatase alcaline ou la peroxydase.

Un traitement préalable approprié des globules rouges à analyser, par exemple par la broméline, permet d'éliminer les faux positifs et d'obtenir des signaux positifs forts et nettement contrastés par rapport aux signaux négatifs, lesquels,
15 grâce à un traitement approprié, se trouvent en fait réduits au niveau des signaux obtenus en l'absence d'antigène.

Le substrat permettant la révélation des réactions peut être avantageusement constitué par une solution d'un chromogène précipitant caractéristique de l'enzyme couplée à
20 l'antiglobuline utilisée. Sous l'action de cette enzyme, le chromogène subit une transformation qui entraîne le dépôt sur la membrane d'un produit coloré insoluble dans l'eau quand la réaction est positive. Après incubation, la réaction de révélation est bloquée en éliminant la solution de chromogène
25 par aspiration et en rinçant les puits à plusieurs reprises avec de l'eau ou avec une solution de blocage, par exemple une solution d'éthylène diamine tétraacétate (EDTA).

Le chromogène mis en oeuvre pour révéler les réactions peut être par exemple une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl
30 p-toluidine phosphate et de nitrobleu tetrazolium (BCIP/NBT), qui produit un précipité bleu-noir insoluble dans l'eau et facilement observable à l'oeil nu.

Dans le cas où l'on veut caractériser les antigènes de surface des globules rouges, le procédé selon l'invention est
35 avantageusement mis en oeuvre selon le protocole opératoire ci-après :

1) Chargement d'une suspension de globules rouges traités par la broméline dans les puits d'une plaque de

microtitration à fond poreux préalablement saturés pendant environ trente minutes par une solution protéique.

5 2) Incubation avec un anticorps ou une série d'anticorps de spécificité parfaitement déterminée , puis élimination des liquides réactionnels par aspiration et lavage des puits avec une solution tampon sous aspiration continue, de manière à éliminer les anticorps excédentaires.

10 3) Chargement dans les puits d'un "conjugué" (anticorps anti IgG ou anti IgM couplé à une enzyme) spécifique de la classe d'immunoglobuline à laquelle appartient le premier anticorps, sous aspiration réduite et continue, puis lavage avec une solution tampon.

15 4) Révélation des réactions par addition d'une solution de substrat chromogène dans chacun des puits traités, et incubation d'une dizaine de minutes à température ambiante sous agitation.

5) Blocage de la révélation par élimination de la solution de substrat par aspiration et lavage des puits.

20 La plaque peut ensuite être séchée dans une étuve pour fixer les résultats, lesquels peuvent être archivés après "pelage" de la membrane.

L'exemple qui suit est fourni à titre d'illustration du procédé selon l'invention, vis à vis duquel il ne présente aucun caractère limitatif.

25

EXEMPLE

Cet exemple porte sur la détection et l'identification des antigènes Rhésus Rh1 à la surface des globules rouges.

30 Une plaque 96 puits à fond poreux reliée à une trompe à vide est saturée par une solution de caséine à 0,5 % pendant 30 minutes.

35 Après aspiration de la phase liquide, on charge les puits d'une suspension à 1 % de globules rouges traités par la broméline, puis on y introduit un anticorps monoclonal anti-Rh1 dilué à 1/100 dans une solution PBS/caséine à 0,1 %.

Après incubation de 15 minutes à température ambiante, sous légère agitation, on élimine les liquides réactionnels par

aspiration. Les globules se déposent sur la membrane au fond des puits, constituant des tapis cellulaires rosés.

Les puits sont ensuite soumis à un cycle de 5 lavages avec 300 µl de tampon, sous aspiration continue, de manière à éliminer les anticorps excédentaires.

On charge alors dans les puits 250 µl d'une dilution au 1/500 d'un conjugué spécifique du premier anticorps utilisé, à savoir un anticorps anti IgG couplé à la phosphatase alcaline, sous aspiration réduite (60 mm Hg) mais continue.

Une fois le volume du deuxième anticorps totalement évacué, les puits sont à nouveau soumis à un cycle de 5 lavages avec 300 µl de tampon.

On charge ensuite les puits de 100 µl d'une solution de substrat, en l'occurrence le mélange BCIP/NBT, et on laisse incuber une dizaine de minutes à température ambiante, sous agitation, après quoi on bloque la révélation en éliminant la solution de substrat par aspiration et en lavant les puits avec une solution d'EDTA 20 mM.

Les signaux positifs apparaissent comme des spots gris à noir selon l'intensité des réactions alors que le "bruit de fond" et les signaux négatifs sont incolores ou légèrement gris-violacé.

Il va de soi que la description qui précède d'un de ses exemples d'application ne saurait limiter la portée de la présente invention.

En effet, si l'exemple d'application ci-dessus décrit la détection et l'identification d'un antigène particulier à la surface des globules rouges, de la même manière, d'autres antigènes de groupes sanguins peuvent être recherchés et mis en évidence.

D'autre part, le procédé peut également s'appliquer à la détection, dans le sérum de patients, d'anticorps spécifiques des antigènes de groupes sanguins en utilisant des globules rouges tests parfaitement caractérisés.

REVENDICATIONS

- 1) Procédé de groupage sanguin faisant appel à des réactions immuno-enzymatiques, caractérisé par la mise en oeuvre d'anticorps spécifiques de la classe d'immunoglobuline à laquelle appartient l'anticorps à tester, couplés chacun à une enzyme,
5 dans des plaques de microtitration à fond poreux dans les puits desquelles se déroulent les réactions successives, les liquides réactionnels étant éliminés après chaque étape du protocole opératoire par aspiration et lavage des puits.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
10 les anticorps spécifiques sont des anticorps anti IgG ou anti IgM.
- 3) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que les enzymes mises en oeuvre sont la phosphatase alcaline ou la peroxydase.
- 15 4) Application du procédé selon l'une des revendications 1 à 3 à la caractérisation des antigènes de surface des globules rouges, caractérisée par la mise en oeuvre du protocole opératoire ci-après :
 - Chargement d'une suspension de globules rouges
20 traités par la broméline dans les puits d'une plaque de microtitration à fond poreux préalablement saturés pendant environ trente minutes par une solution protéique.
 - Incubation avec un anticorps ou une série d'anticorps de spécificité parfaitement déterminée , puis élimination des
25 liquides réactionnels par aspiration et lavage des puits avec une solution tampon sous aspiration continue, de manière à éliminer les anticorps excédentaires.
 - Chargement dans les puits d'un anticorps anti IgG ou anti IgM couplé à une enzyme, sous aspiration réduite et
30 continue, puis lavage avec une solution tampon.
 - Révélation des réactions par addition d'une solution de substrat chromogène dans chacun des puits traités, et incubation d'une dizaine de minutes à température ambiante sous agitation.
 - 35 - Blocage de la révélation par élimination de la solution de substrat par aspiration et lavage des puits.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2702050

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9302420

FA 483046

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	FR-A-2 673 472 (INSTITUT JACQUES BOY) * page 1, ligne 27 - ligne 29 * * page 2, ligne 28 - page 3, ligne 6 * * page 3, ligne 27 - ligne 31 * * page 6, ligne 11 - ligne 24 * ---	1-4
Y	EP-A-0 516 529 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO. LTD.) * colonne 2, ligne 46 - ligne 54 * ---	1-4
Y	EP-A-0 508 427 (YANAGI ET AL.) * page 9, ligne 8 - ligne 16; figure 4A * ---	1-4
A	DE-A-4 124 778 (FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA) * abrégé; figure 2; exemple 6 * ---	1,4
A	DE-A-4 113 255 (OLYMPUS OPTICAL COMPANY LTD) * le document en entier * ---	1,4
E	EP-A-0 542 655 (INSTITUT JACQUES BOY) * le document en entier * -----	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		G01N B01L
Date d'achèvement de la recherche 29 OCTOBRE 1993		Examinateur CEDER O.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document interchangeable</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons * : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM L503 03.82 (P0412)